

**No title available.**

Patent Number: DE4130546  
Publication date: 1993-03-18  
Inventor(s): EWERS ROLF PROF DR DR (AT); KIRSCH AXEL DR (DE); BAYLINK DAVID J PROF (US)  
Applicant(s):: EWERS ROLF (AT); KIRSCH AXEL (DE); BAYLINK DAVID J (US)  
Requested Patent: ☐ DE4130546  
Application Number: DE19914130546 19910913  
Priority Number(s): DE19914130546 19910913  
IPC Classification: A61F2/28 ; A61L27/00  
EC Classification: A61L27/26, A61L27/54, A61F2/28, A61K38/18, A61K38/18C, A61K38/18E, A61K38/30, A61L27/22R, A61L27/36  
Equivalents: AU2553992, ☐ EP0557498 (WO9305823), B1, JP6503358T, ☐ WO9305823

**Abstract**

The invention concerns a bone-growth-stimulating composition containing at least one substance selected from the group comprising the growth factors FGF, TGF- beta , IGF-II and PDGF and biologically active mutants and fragments thereof, bone extracts of appropriate activity and a bone extract with BMP activity, in combination with a suitable application material. The invention also concerns these of such compositions.

Data supplied from the esp@cenet database - I2



⑬ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑩ DE 41 30 546 A 1

⑤① Int. Cl. 5:  
A 61 L 27/00  
A 61 F 2/28

⑳ Aktzeichen: P 41 30 546.9  
㉑ Anmeldetag: 13. 9. 91  
㉒ Offenlegungstag: 18. 3. 93

DE 41 30 546 A 1

⑦① Anmelder:

Baylink, David J., Prof., Loma Linda, Calif., US;  
Ewers, Rolf, Prof. Dr. Dr., Wien, AT; Kirsch, Axel, Dr.,  
7024 Filderstadt, DE

⑦④ Vertreter:

Boehmert, A., Dipl.-Ing.; Hoormann, W., Dipl.-Ing.  
Dr.-Ing., 2800 Bremen; Goddar, H., Dipl.-Phys.  
Dr.rer.nat.; Liesegang, R., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.;  
Münzhuber, R., Dipl.-Phys., 8000 München; Winkler,  
A., Dr.rer.nat., 2800 Bremen; Busch, T., Dipl.-Ing.,  
O-7010 Leipzig; Tönhardt, M., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.,  
Pat.-Anwälte, 8000 München; Stahlberg, W.; Kuntze,  
W.; Kouker, L., Dr.; Huth, M., 2800 Bremen;  
Nordemann, W., Prof. Dr.; Vinck, K., Dr.; Hertin, P.,  
Prof. Dr.; vom Brocke, K., Rechtsanwälte, 1000 Berlin

⑦② Erfinder:

Ewers, Rolf, Prof. Dr. Dr., Wien, AT; Kirsch, Axel, Dr.,  
7024 Filderstadt, DE; Baylink, David J., Prof., Loma  
Linda, Calif., US

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Knochenwachstumsfördernde Zusammensetzung

⑤⑦ Knochenwachstumsfördernde Zusammensetzung, mit ei-  
nem Gehalt an wenigstens einer Substanz aus der Gruppe,  
die aus den Wachstumsfaktoren FGF, TGF- $\beta$ , IGF-II, PDGF  
und biologisch aktiven Mutanten und Fragmenten derselben  
und Knochenextrakten mit entsprechender Aktivität sowie  
einem Knochenextrakt mit BMP-Aktivität besteht, in Kombi-  
nation mit einem geeigneten Applikationsmaterial, sowie  
deren Verwendung.

DE 41 30 546 A 1

Die Erfindung betrifft eine knochenwachstumsfördernde Zusammensetzung, insbesondere zur Verwendung bei der Herstellung von Implantatmaterial.

Implantatmaterial, wie es heutzutage verwendet wird, besteht aus autologem Knochenmaterial, heterologem Knochenmaterial oder irgendeiner Form von Hydroxylapatit. Die Erklärung für die Verwendung eines solchen Implantatmaterials liegt darin, daß dieses Material die Heilung eines Knochendefektes schneller fördert, als wenn der Knochendefekt unbehandelt bleibt. Verschiedene Arten von Implantaten beschleunigen somit das Auffüllen des Knochendefekts. Wegen der Unmöglichkeit, ausreichend autologes Implantatmaterial zu beschaffen, sind heutzutage Hydroxylapatitformen von Implantatmaterial weitverbreitet. Das Problem mit Hydroxylapatitformen von Implantatmaterial besteht jedoch darin, daß sie nicht so schnell durch knöchernes Einwachsen eingebaut werden, wie es wünschenswert wäre, was die Behinderung des Patienten verlängert.

Aus der WO 88/00 205 ist bekannt, daß gewisse morphogene Knochenproteine, nämlich BMP-1, BMP-2 Klasse I, BMP-2 Klasse II, BMP-3 und Gemische derselben, in einem physiologisch akzeptablen Vehikel bei der Erforschung und Behandlung von Knochen- und Periodontaldefekten nützlich sind. Außerdem schlägt diese Anmeldung vor, eine Matrix zuzusetzen, die in der Lage ist, die Zusammensetzung an den Ort des Knochendefekts zu bringen und eine Struktur für die Indozierung von Knochenbildung zur Verfügung zu stellen, z. B. Hydroxylapatit.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Zusammensetzung zur Verfügung zu stellen, die ein geeignetes Applikationsmaterial, wie etwa Hydroxylapatit für Knochenwachstum umfaßt, daß so verbessert ist, daß das optimale Einwachsen von Knochen in dieses Material gefördert wird.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe bei einer knochenwachstumsfördernden Zusammensetzung durch einen Gehalt an wenigstens einer Substanz aus der Gruppe, die aus den Wachstumsfaktoren FGF, TGF- $\beta$ , IGF-II, PDGF und biologisch aktiven Mutanten und Fragmenten derselben und Knochenextrakte mit entsprechender Aktivität sowie einem Knochenextrakt mit BMP-Aktivität besteht, in Kombination mit einem geeigneten Applikationsmaterial gelöst. Überraschenderweise konnte gezeigt werden, daß nicht nur die bekannten Proteine der WO 88/00 205 das Einwachsen von Knochen in geeignetes Applikationsmaterial fördern können, sondern daß diese Aufgabe auch von weiteren Wachstumsfaktoren gelöst wird, nämlich FGF, TGF- $\beta$ , IGF-II, PDGF und biologisch aktiven Mutanten und Fragmenten derselben und von Knochenextrakten mit entsprechender Aktivität sowie von Knochenextrakten mit BMP-Aktivität.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Applikationsmaterial Hydroxylapatit. Außerdem kann das Applikationsmaterial porös sein und vorzugsweise eine regulierbare Porengröße besitzen.

Die bevorzugtesten Applikationsmaterialien für die Zwecke der vorliegenden Erfindung bestehen aus Algen-, Korallen- und/oder Muschelderivat(en), wie diese z. B. aus der US PS 39 29 971 oder aus der DE-PS 35 42 744 bekannt sind. Solch ein Material hat sich als besonders nützlich als Knochenimplantatmaterial herausgestellt.

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Zusam-

mensetzung einen Gehalt an wenigstens einem Salz aus der Gruppe, die aus Vanadaten, Molybdaten und Fluoriden besteht. Obgleich es bereits bekannt ist (europäische Patentanmeldung 02 89 314), daß die Kombination von IGF-II und Fluorid bei der Steigerung der Vermehrung von Knochenzellen wirksam ist, hat es sich überraschenderweise gezeigt, daß jede der Kombinationen aus wenigstens einem der genannten Wachstumsfaktoren (oder einem der genannten biologischen aktiven Mutanten oder Fragmente oder Knochenextrakte) und wenigstens einem der genannten Salze in dieser Hinsicht in wenigstens vergleichbarem Maße wirksam ist.

In einem ersten Ansatz, diese Befunde zu erklären, vermuten wir, daß der Verstärkungseffekt von Fluorid-, Vanadat- oder Molybdatverbindungen auf deren hemmender Wirkung auf Phosphotyrosylproteinphosphatase beruht. Dieses Enzym bewirkt die Dephosphorylierung von Phosphoproteinen, induziert durch mitogene Signale, wodurch diese mitogenen Signale inaktiviert werden. Durch Hemmung dieser Dephosphorylierung fördert man dann das mitogene Signal, das vom Wachstumsfaktor erzeugt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist BMP oder eine biologisch aktive Mutante oder ein biologisch aktives Fragment desselben an Stelle oder zusätzlich zu einem der genannten Faktoren bzw. deren biologisch aktiven Mutanten oder Fragmenten enthalten.

Außerdem schlägt die Erfindung vor, eine Zusammensetzung mit einem Gehalt an wenigstens zwei Substanzen aus der Gruppe, die aus den Wachstumsfaktoren FGF, TGF- $\beta$ , IGF-II, PDGF, BMP und biologisch aktiven Mutanten und Fragmenten derselben sowie Knochenextrakten mit der entsprechenden Aktivität besteht, zu verwenden, am bevorzugtesten vier Wachstumsfaktoren in Kombination. In diesen Zusammensetzungen ist gezeigt worden, daß die Kombination von zwei oder mehr der genannten Wachstumsfaktoren (von denen eine oder mehrere fakultativ durch einen biologisch aktiven Mutanten oder ein biologisch aktives Fragment ersetzt sind) nicht nur eine additive Wirkung auf die Vermehrung und Differenzierung von Knochenzellen haben, sondern einen überraschend merkbaren Synergismus schaffen.

Vorzugsweise ist das Vanadat-, Molybdat- oder Fluorid-Ion mit einem Kation verknüpft, das ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus Natrium, Kadmium, Calcium, Magnesium und Ammonium besteht, die physiologisch besonders akzeptable Kationen darstellen.

Die in den Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung verwendeten Wachstumsfaktoren können durch eine Reihe von verschiedenen Techniken hergestellt werden.

Erstens schlägt die vorliegende Erfindung vor, daß wenigstens einer von ihnen aus natürlichem, vorzugsweise menschlichem Knochenmaterial gewonnen wird, wie z. B. IGF-II, von Mojan et al., Biochem. Biophys. Acta 884, 234 (1986) beschrieben. Alternativ dazu können die Wachstumsfaktoren auch aus Knochenzellen isoliert werden, die in Kultur gezüchtet worden sind.

Der zweite Weg für die Gewinnung der Wachstumsfaktoren ist die Isolierung aus Serum, einschließlich Human-, Rinder-, Schafs-, Schweine- oder Pferdeserum, unter Verwendung herkömmlicher Techniken.

Die dritte (und möglicherweise letztendlich die bevorzugte) Herstellungsmethode umfaßt jedoch rekombinante DNA-Techniken, d. h. die Gewinnung der Wachstumsfaktoren oder der biologisch aktiven Mutan-

ten oder Fragmente derselben als rekombinante Verbindung aus einem gentechnologischen Verfahren. Einige dieser Techniken sind z. B. für IGF-II in obengenannter europäischer Patentanmeldung 02 89 314 und für BMP in obengenannten Internationalen Patentanmeldung WO 88/00 205 beschrieben.

Schließlich kann sich die erfindungsgemäße Zusammensetzung durch einen Gehalt an einem mitogenen Knochenextrakt auszeichnen. Die Herstellung eines solchen wirksamen Knochenextrakts, der einen oder mehrere der genannten Wachstumsfaktoren enthält, kann mit Hilfe herkömmlicher Techniken durchgeführt werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung für die Herstellung von Implantatmaterial. Die erfindungsgemäße Zusammensetzung fördert das optimale Einwachsen von Knochen in das Implantatmaterial, wobei letztendlich ein schnelles Auffüllen von z. B. einem Knochendefekt verwirklicht werden kann. Ein Weg, solch ein Implantatmaterial herzustellen besteht darin, eine der genannten erfindungsgemäßen Kombinationen aus einem oder mehreren der genannten Wachstumsfaktoren oder biologisch aktiven Mutanten oder Fragmenten derselben oder aus einem entsprechenden Knochenextrakt, fakultativ kombiniert mit einem der genannten Salze aus der Gruppe der Vanadate, Molybdate und Fluoride, auf poröse Hydroxylapatit-Körner als Applikationsmaterial aufzubringen. Es hat sich gezeigt, daß ein chirurgisch erzeugter Knochendefekt mit solchen Hydroxylapatit-Körnern, verglichen mit Hydroxylapatit allein, schneller und vollständiger ausheilt.

Die Erfindung wird nunmehr an Hand der folgenden Beispiele weiter veranschaulicht:

#### Beispiel 1

FGF erhöht die Vermehrung normaler menschlicher Knochenzellen

Die Zellvermehrung wurde durch Einbau von tritiiertem Thymidin in DNA bewertet. Die Zellen wurden 16 Stunden lang FGF ausgesetzt und dann mit 0,75 mCi tritiiertem Thymidin markiert. Nach zwei Stunden wurde das Medium abgezogen und die Zellen zweimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung gespült. Die Menge an TCA-unlöslicher Radioaktivität wurde dann als ein Index für DNA-Synthese gemessen. Die zugesetzte Menge an FGF betrug 300 pg/ml. Für diese Studien wurden die menschlichen Knochenzellen in serumfreien DMEM-Medium kultiviert. Es konnte eine fünffache Steigerung in der Zellvermehrung in Kulturen, die mit FGF behandelt wurden, verglichen mit Kontrollkulturen, festgestellt werden (siehe Fig. 1).

#### Beispiel 2

PDGF steigert die Vermehrung von normalen menschlichen Knochenzellen

Die Zellvermehrung wurde durch Einbau von tritiiertem Thymidin in DNA bewertet. Die Zellen wurden 16 Stunden lang PDGF ausgesetzt und dann mit 0,75 mCi tritiiertem Thymidin markiert. Nach zwei Stunden wurde das Medium abgezogen und die Zellen zweimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung gespült. Die Menge an TCA-unlöslicher Radioaktivität wurde dann als ein Index für DNA-Synthese gemessen. Die zugesetzte

Menge an PDGF betrug 10 ng/ml. Für diese Studien wurden die menschlichen Knochenzellen in serumfreiem DMEM-Medium kultiviert. Es wurde ein siebenfacher Anstieg in der Zellvermehrung in Kulturen festgestellt, die mit PDGF behandelt wurden, verglichen mit Kontrollkulturen (siehe Fig. 2).

#### Beispiel 3

Vergleichbare Ergebnisse wurden mit TGF- $\beta$ , IGF-II und Knochenextrakt mit entsprechender Aktivität oder BMP-Aktivität und Gemischen derselben erhalten.

#### Beispiel 4

Für die Anwendung der vorliegenden Erfindung wurden 750  $\mu$ m Hydroxylapatit mit 250  $\mu$ m Natriumfluorid und 200 ng FGF, TGF- $\beta$ , IGF-II, PDGF, Knochenextrakt mit entsprechender Aktivität oder BMP-Aktivität oder Gemischen derselben komplexiert, um ein Implantat herzustellen. Solche Implantate erwiesen sich als nützlich für die Behandlung von Knochendefekten, wie bei unregelmäßigen Brüchen, bei allen Defekten aus Trauma oder chirurgischem Eingriff, in Verbindung mit Krebs, bei allen Defekten aus Infektion (Osteomyelitis), bei alveolaren Defekten und bei Periodontalerkrankungen und kongenitalen Anomalien. Bei allen getesteten Implantaten war das Einwachsen von Knochen signifikant erhöht.

Die in der vorstehenden Beschreibung, sowie in den Ansprüchen und in den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren Ausführungsformen wesentlich sein.

#### Patentansprüche

1. Knochenwachstumsfördernde Zusammensetzung, **gekennzeichnet** durch einen Gehalt an wenigstens einer Substanz aus der Gruppe, die aus den Wachstumsfaktoren FGF, TGF- $\beta$ , IGF-II, PDGF und biologisch aktiven Mutanten und Fragmenten derselben und Knochenextrakten mit entsprechender Aktivität sowie einem Knochenextrakt mit BMP-Aktivität besteht, in Kombination mit einem geeigneten Applikationsmaterial.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Applikationsmaterial Hydroxylapatit ist.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Applikationsmaterial porös ist.
4. Zusammensetzung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das poröse Applikationsmaterial eine regulierbare Porengröße besitzt.
5. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Applikationsmaterial aus Algen-, Korallen- und/oder Muschelderivat(en) besteht.
6. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch einen Gehalt an wenigstens einem Salz aus der Gruppe, die aus Vanadaten, Molybdaten und Fluoriden besteht.
7. Zusammensetzung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß an Stelle oder zusätzlich zu einem der genannten Wachstumsfaktoren bzw. deren biologisch aktiven Mutanten oder Fragmenten BMP oder eine biologisch aktive Mutante oder ein

biologisch aktives Fragment desselben enthalten ist.

8. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch einen Gehalt an wenigstens zwei Substanzen aus der Gruppe, die aus den Wachstumsfaktoren FGF, TGF- $\beta$ , IGF-II, PDGF, BMP und biologisch aktiven Mutanten und Fragmenten derselben sowie Knochenextrakten mit derselben Aktivität, besteht. 5
9. Zusammensetzung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß sie in Kombination vier Wachstumsfaktoren enthält, von denen einer oder mehrere fakultativ durch eine biologisch aktive Mutante oder ein entsprechendes Fragment ersetzt sind. 10
10. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das mit dem Vanadat-, Molybdat- und Fluorid-Ion verknüpfte Kation ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium und Ammonium besteht. 15 20
11. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Wachstumsfaktoren aus natürlichem Knochenmaterial gewonnen ist.
12. Zusammensetzung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Wachstumsfaktoren aus menschlichem Knochenmaterial gewonnen ist. 25
13. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Wachstumsfaktoren aus Serum, einschließlich Human-, Rinder-, Schafs-, Schweine- oder Pferdeserum, gewonnen ist. 30
14. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Wachstumsfaktoren bzw. eine (eines) von deren biologisch aktiven Mutanten oder Fragmenten als rekombinante Verbindung aus einem gentechnologischen Verfahren gewonnen ist. 35
15. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch einen Gehalt an einem mitogenen Knochenextrakt. 40
16. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, zur Herstellung von Implantatmaterial. 45
17. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß poröse Hydroxylapatit-Körner als Applikationsmaterial mit den übrigen Bestandteilen der Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 15 überzogen werden. 50

---

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

---

55

60

65

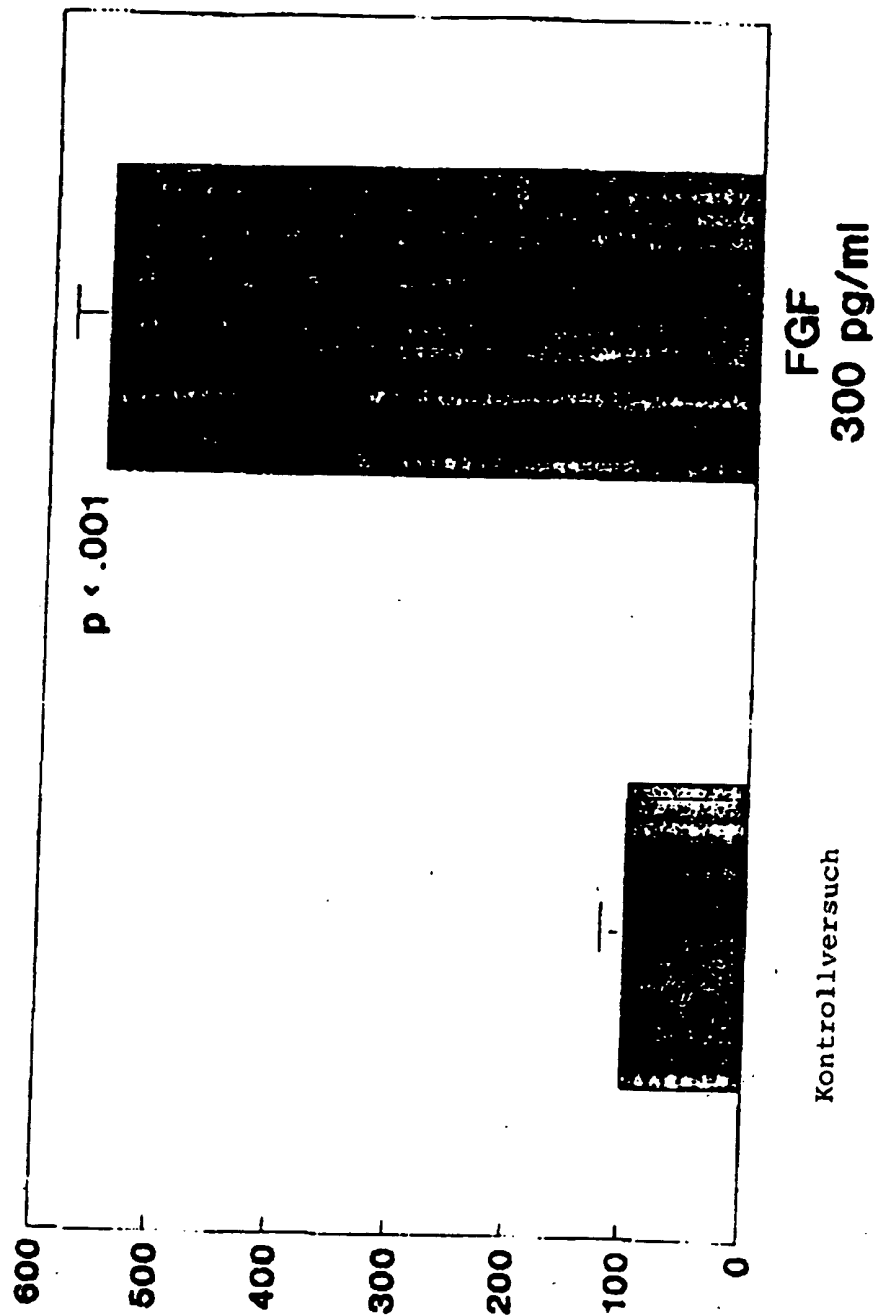


Fig. 1

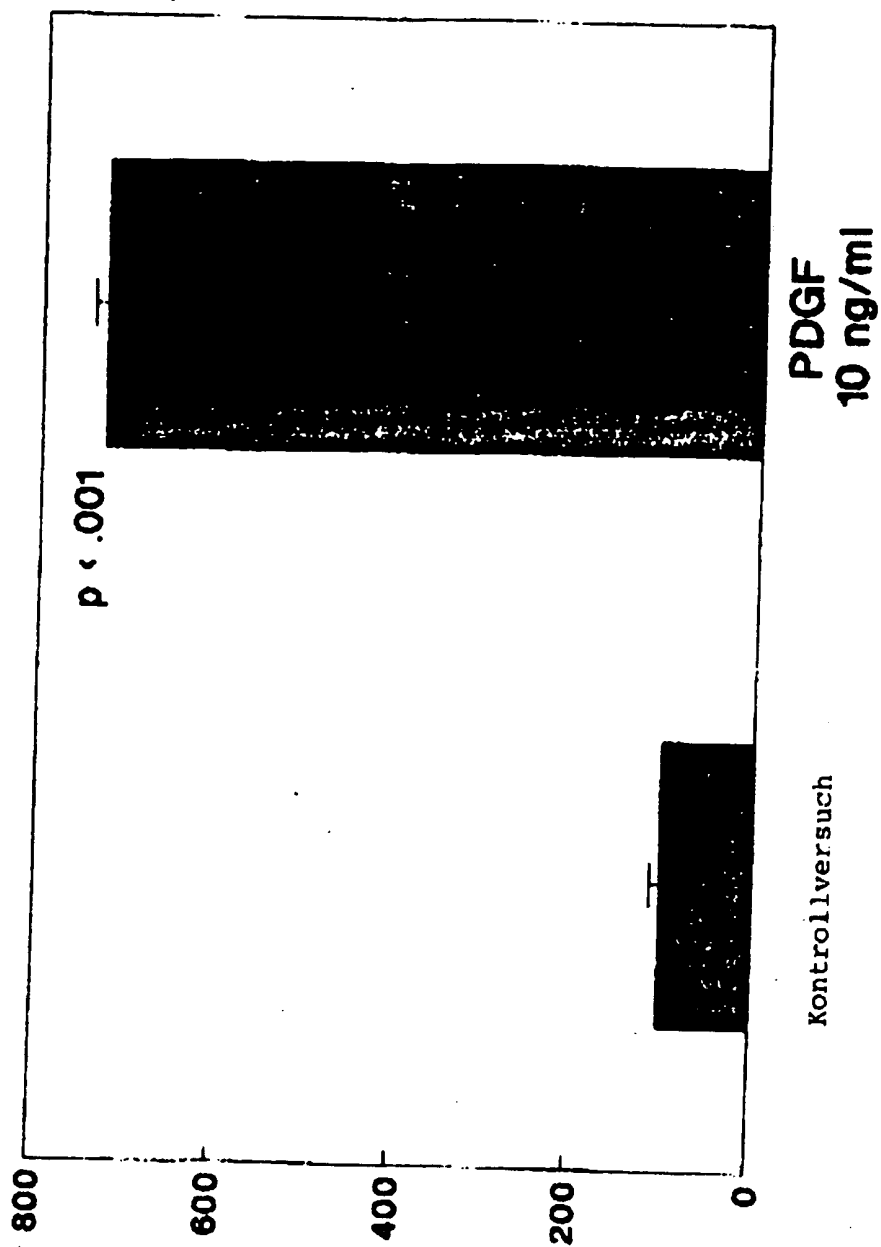


Fig. 2